
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Técnicas de Diagnóstico in vitro disponibles para COVID-19: utilidades y limitaciones

Laboratory diagnosis in vitro available for COVID-19: Contributions and Limitations

Patricia Dözl Torres¹

¹Estudiante pregrado Licenciatura en Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

RESUMEN

La magnitud de los desafíos para el control de la actual pandemia de enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), requiere de técnicas de diagnóstico precisas y eficientes, para permitir la toma de decisiones y capacidad de respuesta. Los diversos tipos de técnicas de diagnóstico, sirven para determinados propósitos y responden a necesidades diagnósticas en etapas distintas de la infección y seguimiento. Variables como el tipo o la temporalidad de obtención de la muestra, condicionan la información que se recaba.

La técnica reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (rt-PCR), se basa en la detección de genoma viral y es la técnica de referencia con la que se comparan las otras, es la más confiable y establecida. Sin embargo, esta técnica tiene limitaciones, como el tiempo de respuesta y el requerimiento de instalaciones complejas. Las técnicas alternativas, muchas aún en desarrollo, apuntan a suplir estas restricciones y ofrecer un diagnóstico rápido, barato, reproducible y universalmente disponible. Algunas de ellas utilizan el mismo principio que la rt-PCR o bien usan indicadores de la respuesta inmunológica del hospedero. Las pruebas rápidas antigénicas y serológicas basadas en inmunoensayos de flujo lateral tienen baja sensibilidad. Algunas tecnologías emergentes, muestran una alta sensibilidad y especificidad, pudiendo ayudar en el tamizaje poblacional. **PALABRAS CLAVE:** Técnicas diagnósticas, pandemia por enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (rt-PCR), sensibilidad y especificidad.

ABSTRACT

The magnitude of the challenges for the control of the current pandemic of coronavirus disease 2019 (COVID-19), require accurate and efficient diagnostic test, to allow decision making and response capacity. The various types of diagnostic test serve specific purposes and respond to diagnostic needs at different stages of infection and follow-up. Variables such as the type of sample or when it was obtained, condition the information obtained.

The real-time reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction (rt-PCR), based on viral genome detection, is established as gold standard with which the others are compared. However, this technique has limitations, such as turnaround time and the requirement for specific facilities. Alternative techniques, many of which are still in development, aim to overcome these constraints and offer a fast, inexpensive, reproducible and universally available diagnostic. Some use the same principle as rt-PCR or use indicators of the host's immune response. Rapid antigenic and serological tests based on lateral flow immunoassays have low sensitivity. Some emerging technologies show a high sensitivity and specificity, which can help in population screening.

KEYWORDS: Diagnostic Tests, Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) pandemic, Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (rt-PCR), Sensitivity and Specificity

INTRODUCCIÓN

El manejo adecuado de la actual pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), causada por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave tipo 2 (SARS-CoV-2), requiere del resultado oportuno de las técnicas de las diagnósticas disponibles, que dadas la falta de vacuna y de tratamiento específico (1), es el medio que se dispone para hacerle frente. Esto permite identificar y aislar a los infectados, disminuyendo la transmisión. Para ello es necesario que las pruebas diagnósticas sean precisas, confiables y rápidas.

Además, la aplicabilidad masiva de las mismas permitiría estudiar la dinámica poblacional y hacer una adecuada vigilancia epidemiológica, determinando qué sujetos son infectantes, recuperados e inmunes (2).

Las técnicas existentes van a recoger información sobre el estado de la infección, esté en curso o ya resuelta, en forma de biomarcadores; es decir, ARN o antígenos de SARS-CoV-2, o bien de los anticuerpos reactivos a él. La precisión de la información recabada, depende del tipo de técnica y de los factores que la modifican. En general se espera que estas puedan ser sensibles y específicas, minimizando así los falsos negativos y positivos.

Por ejemplo, las técnicas de amplificación de material genético como rt-PCR, basan su especificidad en utilizar cebadores o partidores capaces de unirse a secuencias específicas de SARS-CoV-2, cuyo diseño fue facilitado gracias a la publicación del genoma viral completo (3). Por otro lado, su sensibilidad depende de la capacidad de detectar el ARN dependiendo de su cantidad presente al momento de la recolección.

El abanico de técnicas disponibles y en desarrollo es amplio. Estas varían el tipo de su molécula blanco, la cual también depende del cómo y el cuándo se detectará. Por eso es importante conocer el curso de la infección, las vías de excreción y la respuesta inmune.

En esta revisión se describirán brevemente las técnicas más utilizadas y también algunas en desarrollo, haciendo énfasis en la rt-PCR. Se indicarán sus principales ventajas y limitaciones, aludiendo a su sensibilidad y especificidad.

CARGA VIRAL, EXCRECIÓN VIRAL Y SEROCONVERSIÓN

Después de la infección e incubación del virus, la carga viral (copias de genoma viral por mL) aumenta exponencialmente y entonces es posible detectar la replicación activa del virus por medio de su excreción, mientras este puede estar causando un cuadro sintomático (Figura 1).

En general, la carga viral es mayor en los casos graves de COVID-19 (5) y similar entre sintomáticos y asintomáticos (6). Posteriormente, si el sujeto infectado fue capaz de montar una respuesta inmune efectiva, la replicación viral decae y podrían detectarse los anticuerpos en circulación.

La infectividad, es decir su capacidad de contagio, comenzaría en el período presintomático, 2-3 días antes del inicio del cuadro, alcanza su máximo a los 0,7 días y declinando considerablemente después de los 7 días de iniciados los síntomas (7). Este patrón se asemeja más a la influenza estacional que al SARS-CoV del 2003, el cual mostró muestras respiratorias altas positivas más tardíamente, con un máximo a los 7-10 días (8).

La carga viral y el tiempo de excreción varía según el tipo de muestra utilizada. A partir de muestras de torulado nasofaríngeo se ha descrito que la excreción viral de SARS-CoV-2 es más alta durante el pródromo. La cantidad de ARN detectado asciende hasta un máximo de $7,11 \times 10^8$ copias/mL, el día 4 (9) para luego disminuir progresivamente hasta no ser detectada al día 21 (7), y pudiese extenderse hasta los 37 días (5). La carga en esputo es en promedio $7,0 \times 10^6$ copias/mL, con un máximo de $2,35 \times 10^9$ copias/mL, alrededor del día 5 (8). Además el ARN viral ha sido pesquisado en 32% de muestras de aspirado nasofaríngeo después de 3,2 días y en 68% al día 14 (10).

Con respecto a los anticuerpos, IgM es producido por células plasmáticas y está presente durante la respuesta inmunológica temprana, mientras que IgG se prolonga, indicando una posible inmunidad a largo plazo (11). Se ha detectado IgM a partir de los días 5-7 del inicio de los síntomas e IgG entre los días 14-19 (12,9). Aunque se han descrito otros periodos variables (13,14). También es posible que algunos no seroconviertan (15), pero la mayoría lo hace (16).

MUESTRAS BIOLÓGICAS A ESTUDIAR Y SU VALOR DIAGNÓSTICO

El tropismo de SARS-CoV-2 por tejidos humanos está ampliamente distribuido. Entre los tipos celulares vulnerables, encontramos células epiteliales del tracto gastrointestinal y respiratorio, miocardiocitos, células de túbulo proximal, neumocitos, entre otros. (17). Dadas sus manifestaciones eminentemente respiratorias, se eligen muestras de vía aérea alta (torulados oro-/nasofaríngeos) y/o baja (esputo y lavado bronquioalveolar).

En general las infecciones respiratorias virales no son productoras de esputo purulento, por lo que se obtiene por torulado (18), que ya demostró un alto rendimiento con SARS-CoV-1 y MERS-CoV (8,18).

Wang y colegas, estudiaron la tasa de detección por rt-PCR en 205 pacientes, con 1-3 días de hospitalización por COVID-19. Ellos describen que los lavados broncoalveolares tienen el máximo (93%), pero su obtención es un proceso invasivo y riesgoso para el personal. Decrecientemente le sigue esputo (72%), torulados nasales (63%) y faríngeos (32%), cepillados de fibroscopia (46%), heces (29%) y sangre (1%) (19). También informó una tasa de positividad del 15-30% en sangre (20). Esta última, pudiese utilizarse para monitorear una posible viremia.

El torulado nasofaríngeo, en relación a su tasa de positividad y accesibilidad de obtención (21,22,23), sería la muestra más adecuada para realizar rt-PCR de rutina (24).

Dada la presentación de sintomatología gastrointestinal, se han estudiado heces, demostrando una positividad de alrededor del 48-70%. En estas se detecta una excreción viral más tardía (25), prolongándose por 11,2 días de iniciados los síntomas e incluso después que las muestras respiratorias se vuelvan negativas (26,27). Aún así la transmisión oro-fecal no está demostrada (28,29).

El análisis de orina de pacientes infectados, detectó ARN viral en un 42% después de 15 días del inicio de los síntomas (25). También se ha encontrado en secreciones oculares (30), pero en ambos casos hay menor evidencia.

La saliva es una prometedora alternativa, ya que supone menos riesgo para el personal de salud, menor incomodidad para el paciente y la potencial capacidad de masificar su recolección poblacional (31). En suero también han habido resultados de rt-PCR positivos después de hacerse negativo el torulado nasofaríngeo (32), pero no ha sido reproducible en otros estudios (33).

En general, para demostrar aclaramiento viral, las muestras deberían ser repetidas, aumentando significativamente la certeza diagnóstica (34). En torulados nasofaríngeos, se estimó una mejora del 27% al realizarla dos veces y del 43% al realizar tres veces (35). En pacientes con neumonía, la carga viral sería suficiente (34).

TÉCNICAS: LAS USADAS, LAS DISPONIBLES Y LAS QUE ESTÁN EN DESARROLLO

Actualmente las técnicas disponibles se dividen clásicamente en dos categorías: los métodos que identifican componentes del mismo virus, como genoma (en rt-PCR) o antígenos;

y los serológicos que detectan anticuerpos en individuos que ya han desarrollado respuesta inmune (36). Estos métodos se utilizan con propósitos complementarios: confirmar la infección aguda y desarrollo de inmunidad.

La información que se obtiene depende de la técnica y de cómo varía según el curso de la infección. Por ejemplo, en los ensayos basados en amplificación de genoma requieren que estos se hagan precozmente, ya que la cantidad detectable de copias de ARN disminuye con el tiempo (18)(Figura 1).

Un concepto al que apunta el desarrollo de técnicas nuevas es el de "diagnóstico en el punto de atención" (POCT), que pretende que los ensayos sean de baja complejidad, en el mismo entorno del paciente y con resultados rápidos (1).

La detección de partículas virales infectivas mediante aislamiento viral no es un método diagnóstico idóneo (37) ya que requiere de líneas celulares permisivas, el proceso es lento, necesita de personal experimentado e infraestructura adecuada a un nivel de bioseguridad (38).

1. RT-PCR, el estándar internacional

La técnica amplifica un fragmento del genoma viral, y su detección se correlaciona con la excreción viral; tiene alta sensibilidad y especificidad y puede realizarse en diversos tipos de muestras. Se requiere una técnica cuantitativa (PCR en tiempo real cuantitativo o rt-qPCR) para determinar la carga viral.

Primero se debe extraer y purificar el ARN total de la muestra, para luego someterse a la transcripción inversa y obtener ADN complementario (ADNc), el cual finalmente se amplifica por medio de PCR de tiempo real utilizando una mezcla de reactivos que contiene los cebadores específicos, la sonda fluorescente de reconocimiento y la polimerasa.

Se utiliza preferentemente la rt-PCR de "un solo paso", es decir que la transcripción inversa y PCR se realizan en una sola reacción continua, disminuyendo el tiempo de manejo de muestras. Frente a la "de dos pasos", que aunque más flexible, tiene mayores posibilidades de contaminación cruzada, prolonga el tiempo de obtención de resultados, siendo menos efectiva para la detección masiva de SARS-CoV-2 (39).

La técnica requiere determinar los genes o sectores del genoma que serán blanco de amplificación. En el caso de SARS-CoV-2, la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), ORF1ab; o bien para las proteínas estructurales como glicoproteína Spike (S), nucleocápside (N) y envoltura (E) (40,37,21). Muchos de los ensayos disponibles amplifican más de un gen blanco,

lo que aumenta la sensibilidad y especificidad de la detección, como usar zonas del genoma conservadas en coronavirus y otras específicas para SARS-CoV-2 (Tabla 1). Los estudios en ensayos rt-PCR que apuntan a los genes E y RdRp han mostrado alta sensibilidad sin reactividad cruzada para otros coronavirus (40).

No obstante rt-PCR tiene limitaciones como el tiempo el resultado (2-4 horas), el tiempo de transporte y del proceso de extracción del ARN, tiene una ventana de oportunidad limitada (mientras dure la excreción viral); requiere de personal entrenado y de un laboratorio con infraestructura y equipo adecuados, como un termociclador (42).

Sensibilidad y especificidad para rt-PCR

Para evaluar la sensibilidad se usa el Límite de detección inferior (LOD), que corresponde al número mínimo de copias presentes que requiere un determinado ensayo para detectar al virus, mientras menor sea este número, el ensayo es más sensible.

Al comparar algunos ensayos comerciales se ha establecido que se requieren 100 copias de ARN viral/ μ L de ácido nucleico extraído, es decir un LOD de 500 copias por reacción, para tener máxima sensibilidad (40,43,44,46,47)

En vista de las necesidades previamente expuestas y de las características de la técnica de actual uso, se ha impulsado el desarrollo de otras técnicas conocidas, que han salido al mercado. Estos buscan precisamente abaratar costos, aumentar la rapidez, disminuir la dependencia de laboratorios céntricos, actualmente colapsados.

Las alternativas:

1.2. Otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT)

Técnicas como la amplificación isotérmica mediada por bucle (rt-LAMP) o la amplificación mediada por transcripción (TMA) prescinden del termociclador, pues son técnicas isotérmicas, disminuyendo el costo, el tiempo y la complejidad de llevar a cabo la técnica. Son específicos y pueden seguirse en tiempo real (como rt-PCR), pudiendo medirse el precipitado de subproductos que se generan o las señales fluorescentes emitidas (36).

RT-LAMP mediante la utilización de partidores específicos y la actividad de transcriptasa inversa y ADN polimerasa dependiente de ADN, produce estructuras de ADN en bucle bicatenario de varios tamaños que contienen repeticiones invertidas de la secuencia blanco detectadas por indicador que se une a ADN, es rápida (13 minutos) y amplifica en mayor cantidad que rt-PCR. Por otro lado, TMA utiliza las

actividades de transcriptasa inversa y T7 ARN polimerasa. Una de sus versiones, captura el ARN mediante sondas unidas a micropartículas magnéticas y luego se desarrolla la transcripción inversa con un partidador que contiene el promotor T7, ya luego la transcripción in vitro estaría amplificando el ARN viral. Sin embargo tienen un LOD más alto que PCR tiempo real (47), lo cual le daría menor sensibilidad.

1.3 Otras técnicas moleculares

CRISPR-Cas

Un conjunto de enzimas bacterianas, “tijeras moleculares”, como Cas9, Cas12 y Cas13 reconocen y cortan secuencias de interés que son repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente intercaladas (CRISPR). Cas 12 y Cas 13 pueden ser modificadas para que reconozcan ARN viral. Esta metodología, de edición de genes por CRISPR-Cas se ha implementado en la detección de SARS-CoV-2, no requiere de termociclador, las enzimas son más económicas, el tiempo de respuesta es rápido, específico y además fáciles de usar, y sin requisitos de una infraestructura compleja de laboratorio. La detección habitualmente es a través de un ARN reportero fluorescente (48,49, 50)

Secuenciación genómica de nueva generación (NGS)

Esta metodología permite secuenciar el genoma de SARS-CoV-2 de la muestra, en caso de estar presente. Es un poco más lenta (24 horas), pero permitiría un gran volumen de muestras y puede ser una forma de vigilancia de cómo está evolucionando el virus (51,52).

Microarreglos

También se basan en la generación de ADNc mediante la transcripción inversa. Usa oligonucleótidos específicos para hibridar el ADNc y detectarlo posteriormente. Este tipo de técnica también permite detectar mutaciones (polimorfismos de un solo nucleótido) (53) y presenta una gran capacidad de muestras por vez. Anteriormente ya se ha probado su utilidad para MERS, gripe y el virus respiratorio sincial (54).

Sin embargo estas dos últimas técnicas, tienen un alto costo asociado, requieren de instrumentación centralizada en laboratorio y de personal especializado, lo cual restringe su uso para diagnóstico clínico.

1.4 Pruebas de antígenos rápidos (RADT)

Estos ensayos, que ya han sido usados en el monitoreo de otros coronavirus (55), detectan antígenos virales directamente, por lo que deberían estar presentes en la fase aguda de la infección. La técnica usa los principios de la inmunocromatografía, con anticuerpos monoclonales conjugados a nanopartículas coloidales a las que SARS-CoV-2 se uniría en caso de estar presente.

La técnica es simple, de menor costo, con resultados en minutos, además su información es cualitativa de fácil interpretación (56). Desafortunadamente cuentan con una tasa de positividad muy variable y baja sensibilidad (57). El desarrollo de nuevos anticuerpos monoclonales contra SARS-CoV-2, perfeccionarían esta técnica (58).

2. Pruebas inmunológicas o serológicas

Estas pruebas se basan en la seroconversión, la cual ocurriría a las 2 semanas, dejando anticuerpos circulantes detectables (36). Los anticuerpos son específicos, por ejemplo para N, pero no exclusivos para SARS-CoV-2, por lo que puede ocurrir reactividad cruzada (59). Además, la presencia de IgG no indica la duración de esta inmunidad, porque el nivel de anticuerpos puede decaer.

Su aplicabilidad permitiría la trazabilidad de casos, realizar una descripción epidemiológica e identificar posibles donantes de anticuerpos que sirvan como tratamiento (60).

Es importante aclarar que no todos los anticuerpos son neutralizantes para SARS-CoV-2 (36), de hecho no siempre han sido detectados (61).

2.1 Ensayos inmunoenzimáticos

Los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) dan información cuantitativa y podrían usarse para establecer posibles umbrales de inmunidad. Estos usan en general, al menos dos genes objetivo (60). El ensayo es capaz de detectar el complejo de antígeno-anticuerpo, gracias a un anticuerpo secundario trazador detectable por colorimetría. El ensayo tarda 1-5 horas, con sensibilidad variable según cada ensayo y tiene alta capacidad para muestras en paralelo (36)

2.2 Ensayos rápidos de flujo lateral

Los ensayos rápidos se basan en inmunocromatografía coloidal, utilizando sangre capilar, lo cual aumentaría la rapidez, disponibilidad, portabilidad y abarataría costos. Sin embargo, estas aún se encuentran en desarrollo aún con escaso respaldo de estudios independientes. Su especificidad y sensibilidad es insuficiente (62,63).

DISCUSIÓN

La pandemia ha llevado al límite la capacidad de respuesta que tenían los centros de diagnóstico con las técnicas tradicionales y generando la necesidad de nuevos métodos, que pudieran suplir estas limitaciones. Así, la agencia estadounidense de Alimentos y Drogas (FDA), involucrada en la validación de las pruebas de laboratorio, ha debido ampliar sus criterios de aprobación (64,65,66)(Tabla 2).

Permitiendo la comercialización de nuevos ensayos con validación apresurada (180) y sin suficientes estudios que respalden su especificidad y sensibilidad (60). Además, la utilización de manera más masiva de rt-PCR tiempo real, ha impactado en la disponibilidad de los reactivos mundialmente, haciendo necesarias técnicas que puedan apoyar el diagnóstico.

Las técnicas diagnósticas que se apliquen deben adecuarse al curso de la infección en que se encuentre el paciente y deben estar respaldadas por estudios independientes que avalen su sensibilidad y especificidad. Cabe mencionar que la mayoría de los estudios publicados son obtenidos de pacientes hospitalizados, y los valores pueden variar respecto a la población general.

Todas las técnicas diagnósticas tienen un porcentaje de falsos negativos, incluso rt-PCR (67), por ello un solo resultado negativo no descarta la infección. Además, estas tampoco son resolutivas por sí mismas, siempre deben interpretarse dado el cuadro clínico del paciente, incluso se sugiere imagenología para hacer un diagnóstico certero (33,68, 69).

Con respecto a los ensayos, aún se trabaja en disminuir la reactividad cruzada, que es una limitante en el diagnóstico específico. Por otro lado, una alta prevalencia de bajas cargas virales, perjudica la sensibilidad de los ensayos con mayores LOD.

Respecto a las muestras, aunque las respiratorias han sido las prevalentes, saliva y heces son nuevas alternativas, la primera para detección de infectados y la segunda para hacer un seguimiento de la excreción viral (28).

Así pues, para el diagnóstico confirmatorio, rt-PCR seguirá siendo el estándar de referencia hasta que las otras técnicas de amplificación, que son actualmente comparables, obtengan más validación (70). No se le conoce valor para tamizaje de asintomáticos, es inefectivo para la fase convaleciente o infección tardía y para vigilancia epidemiológica.

La detección de antígenos rápidos aún está en desarrollo para diagnóstico confirmatorio y los ensayos serológicos para detectar anticuerpos servirían para el tamizaje de asintomáticos, vigilancia epidemiológica y estudios retrospectivos (1).

Como limitación de esta revisión, dada la velocidad de las actualizaciones referentes a COVID-19, los datos aquí presentados pueden rápidamente quedar obsoletos.

Curso de la infección por SARS-CoV-2, biomarcadores y su detección y acciones a tomar

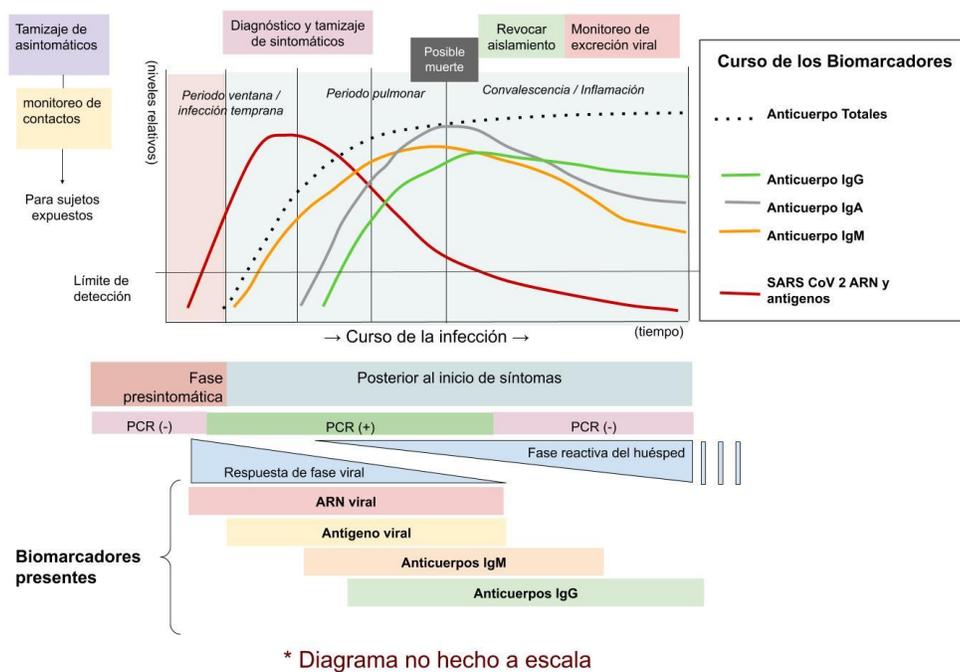


Figura 1. Curso de infección, biomarcadores y acciones a tomar por etapas. Modificado de (1,4)

Resumen de los genes objetivo de algunos protocolos internacional para rt-PCR

Institución	Genes objetivo
CDC Chino	ORF1ab yN
Instituto Pasteur, Paris, Francia	Dos objetivos para RdRP
CDC, Estadounidense	Tres objetivos para N
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Japonés	Pancorona y multiples objetivos, proteína S
Charité, Alemania	RdRP, E, N
Universidad de Hong Kong	ORF1b-nsp14, N
Instituto Nacional de Salud Tailandés	N

Tabla 1. Se muestran los genes objetivo de algunos protocolos internacionales de ensayos de PCR / RT-PCR. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades(CDC). Proteína Envoltura (E); ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp); Gen Orf1ab (Orf1ab) Proteína Nucleocapside (N)(41).

Ejemplos de ensayos in vitro aprobados por la FDA en contexto de Autorización de Uso de Emergencia (EUA)

Entidad	Nombre del ensayo	Tipo de ensayo	objetivo molecular	Muestras
1drop Inc.	1copy™ COVID-19 qPCR Multi Kit	Molecular - RT-PCR de tiempo real	E, RdRp	tNF, tOF, aNF, INF, aN, tN
Abbott Molecular	Abbott RealTime SARS-CoV-2	Molecular - RT-PCR de tiempo real cualitativo	RdRp,N	tNF, tOF
Access Bio, Inc.	CareStart COVID-19 IgM/IgG	Serológico - IFL	IgM y/o IgG	suero o plasma
Centers for Disease Control and Prevention (CDC)	Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay	Molecular - RT-PCR de tiempo real cualitativo Multi-analito	ARN de influenza A, la influenza B y SARS-CoV-2	tNF, tOF, aNF, INF, aN, tN, esputo, IBA, aBA
InBios International, Inc.	S-CoV-2 Detect IgG ELISA	Serológico, IgG ELISA, cualitativo	IgG	suero
Roche Diagnostics	Elecsys IL-6	Serológico, cuantitativo	Interleuquina 6 (IL-6)	suero
DiaCarta, Inc.	QuantiVirus SARS-CoV-2 Multiplex Test Kit	Molecular - RT-PCR de tiempo real cualitativo	N, Orf1ab, E	tNF, tOF, tN, esputo
Phosphorus Diagnostics LLC	Phosphorus COVID-19 RT-qPCR Test	Molecular- RT-qPCR cualitativo	N (N1 y N2)	tNF, tOF, aNF, INF, aN, esputo, IBA
Sherlock BioSciences, Inc.	Sherlock CRISPR SARS-CoV-2 Kit	Molecular - detección cualitativa de ácido nucleico	Orf1ab, N	tNF, tOF, tN, INF, aN, IBA

Tabla 2. Ejemplos de Ensayos aprobados por la FDA, con sus objetivos moleculares y tipos de muestras. Proteína Envoltura (E); ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp); Gen Orf1ab (Orf1ab) Proteína Nucleocapside (N); Torulado Nasofaríngeo (tNF); Torulado orofaríngeo (tOF); Aspirado nasofaríngeo (aNF); lavado Nasofaríngeo (INF); aspirado nasal (aN); torulado Nasal (tN); aspirados bronchoalveolar (aBA), lavado Broncoalveolar (IBA).

Correspondencia

Patricia Dölz Torres
patriciadolz@ug.uchile.cl

Financiamiento

Los autores declaran no haber recibido financiamiento para la realización de este trabajo.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses en relación a este trabajo.

Información sobre el artículo

Recibido el 29 de julio de 2020.

Aceptado el 27 de agosto de 2020.

Publicado el 8 de octubre de 2020.

Referencias

1. Cheng, M., Papenburg, J., Desjardins, M., Kanjilal, S., Quach, C., Libman, M., Dittrich, S. and Yansouni, C., 2020. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2. *Ann Intern Med*, 172(11), pp.726-734.
2. Santiago I. Trends and Innovations in Biosensors for COVID-19 Mass Testing. *Chembiochem*. 2020.
3. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565-574.
4. Johns Hopkins Medicine. Diagnostic Strategy for the COVID-19 Pandemic – Bench to Bedside to Blueprint for Policymakers [Internet]. 2020 [citado el 16 Julio 2020]. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=Lm54QImxIqs&list=PLH2L9cbPdyWgh6XGYrYhGXBlyXPzIEp2P>
5. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054-1062.
6. Walsh K, Jordan K, Clyne B, Rohde D, Drummond L, Byrne P et al. SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. *J Infect*. 2020.
7. He X, Lau E, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(5):672-675.
8. Cheng P, Wong D, Tong L, Ip S, Lo A, Lau C et al. Viral shedding patterns of coronavirus in patients with probable severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2004;363(9422):1699-1700.
9. Wölfel R, Corman V, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller M et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581(7809):465-469.
10. Peiris J, Chu C, Cheng V, Chan K, Hung I, Poon L et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet*. 2003;361(9371):1767-1772.
11. Tuailon E, Bolloré K, Pisoni A, Debieesse S, Renault C, Marie S et al. Detection of SARS-CoV-2 antibodies using commercial assays and seroconversion patterns in hospitalized patients. *J Infect*. 2020.
12. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis*. 2020.
13. Agarwal V, Venkatakrishnan A, Puranik A, Kirkup C, Lopez-Marquez A, Challener D et al. Long-term SARS-CoV-2 RNA Shedding and its Temporal Association to IgG Seropositivity. 2020 Jul.
14. Hung I, Cheng V, Li X, Tam A, Hung D, Chiu K et al. SARS-CoV-2 shedding and seroconversion among passengers quarantined after disembarking a cruise ship: a case series. *Lancet Infect Dis*. 2020.

15. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, Nguyen T, Chromikova V, McMahon M et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med.* 2020;26(7):1033-1036.
16. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J et al. Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020 Apr;.
17. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med.* 2020;14(2):185-192.
18. Loeffelholz M, Tang Y. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections – the state of the art. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):747-756.
19. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA.* 2020;.
20. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020 May;20(5):565-574.
21. Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin Chim Acta.* 2020;505:172-175.
22. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med.* 2020;382(12):1177-1179.
23. Wang X, Tan L, Wang X, Liu W, Lu Y, Cheng L et al. Comparison of nasopharyngeal and oropharyngeal swabs for SARS-CoV-2 detection in 353 patients received tests with both specimens simultaneously. *Int J Infect Dis.* 2020;94:107-109.
24. Tang Y, Schmitz J, Persing D, Stratton C. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *J Clin Microbiol.* 2020;58(6).
25. Peiris J, Chu C, Cheng V, Chan K, Hung I, Poon L et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet.* 2003;361(9371):1767-1772.
26. Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, Zhou J, Dong X et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020 May;5(5):434-435.
27. Cheung K, Hung I, Chan P, Lung K, Tso E, Liu R et al. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology.* 2020 Jul;159(1):81-95.
28. Foladori P, Cutrupi F, Segata N, Manara S, Pinto F, Malpei F et al. SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review. *Sci Total Environ.* 2020 Nov 15; 743: 140444.
29. Zhang Y, Chen C, Zhu S, Shu C, Wang D, Song J et al. Isolation of 2019-nCoV from a Stool Specimen of a Laboratory-Confirmed Case of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *China CDC Weekly.* 2020;2(8):123-124.
30. Xia J, Tong J, Liu M, Shen Y, Guo D. Evaluation of coronavirus in tears and conjunctival secretions of patients with SARS-CoV-2 infection. *J Med Virol.* 2020 Jun ;92(6):589-594.
31. To K, Tsang O, Yip C, Chan K, Wu T, Chan J et al. Consistent Detection of 2019 Novel Coronavirus in Saliva. *Clin Infect Dis.* 2020 Feb;.
32. Li Y, Hu Y, Yu Y, Zhang X, Li B, Wu J et al. Positive result of Sars-Cov-2 in faeces and sputum from discharged patient with COVID-19 in Yiwu, China. *Journal of Medical Virology.* 2020;.
33. Xie C, Jiang L, Huang G, Pu H, Gong B, Lin H et al. Comparison of different samples for 2019 novel coronavirus detection by nucleic acid amplification tests. *International Journal of Infectious Diseases.* 2020;93:264-267.
34. Yan Y, Chang L, Wang L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Rev Med Virol.* 2020;30(3).
35. Shen N, Zhu Y, Wang X, Peng J, Liu W, Wang F et al. Characteristics and diagnosis rate of 5630 subjects receiving SARS-CoV-2 nucleic acid tests from Wuhan, China. *JCI Insight.* 2020 May 21;5(10).
36. Carter L, Garner L, Smoot J, Li Y, Zhou Q, Saveson C et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci.* 2020 May 27; 6(5): 591–605.
37. Chan J, Yip C, To K, Tang T, Wong S, Leung K et al. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 2020 Apr;58(5);.
38. Shih H, Wu C, Tu Y, Chi C. Fighting COVID-19: A quick review of diagnoses, therapies, and vaccines. *Biomed J.* 2020 May 30;S2319-4170(20)30085-8.

39. Wong M, Medrano J. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005 Jul;39(1):75-85.
40. Corman V, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu D et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020 Jan; 25(3): 2000045.
41. PCR protocol WHO summary [Internet]. World Health Organization; 2020. Disponible en: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa_2
42. World Health Organization. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19 [Internet]. WHO; 2020. Disponible: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331509/WHO-COVID-19-lab_testing-2020.1-eng.pdf
43. Vogels C, Brito A, Wyllie A, Fauver J, Ott I, Kalinich C et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nat Microbiol*. 2020 Jul.
44. Perng C, Jian M, Chang C, Lin J, Yeh K, Chen C et al. Novel rapid identification of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by real-time RT-PCR using BD Max Open System in Taiwan. *PeerJ*. 2020;8:e9318.
45. Pfefferle S, Reucher S, Nörz D, Lütgehetmann M. Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system. *Euro Surveill*. 2020 Mar 5; 25(9): 2000152.
46. van Kasteren P, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, de Jonge J, van den Brandt A et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J Clin Virol*. 2020 Jul;128:104412.
47. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15; 28(12): e63.
48. Wang X, Zhong M, Liu Y, Ma P, Dang L, Meng Q et al. Rapid and sensitive detection of COVID-19 using CRISPR/Cas12a-based detection with naked eye readout, CRISPR/Cas12a-NER. *Sci Bull (Beijing)*. 2020 May 5.
49. Chekani-Azar S, Gharib Mombeni E, Birhan M. CRISPR/Cas9 gene editing technology and its application to the coronavirus disease (COVID-19), a review. *J Life Sci Biomed*. 2020;10(1):01-09.
50. Huang Z, Tian D, Liu Y, Lin Z, Lyon C, Lai W et al. Ultra-sensitive and high-throughput CRISPR-powered COVID-19 diagnosis. *Biosens Bioelectron*. 2020 May; 164: 112316.
51. Ai J, Zhang Y, Zhang H, Xu T, Zhang W. Era of molecular diagnosis for pathogen identification of unexplained pneumonia, lessons to be learned. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Mar 16;9(1):597-600.
52. First NGS-based COVID-19 diagnostic. *Nat Biotechnol*. 2020;38(7):777-777.
53. Guo X, Geng P, Wang Q, Cao B, Liu B. Development of a Single Nucleotide Polymorphism DNA Microarray for the Detection and Genotyping of the SARS Coronavirus. *J Microbiol Biotechnol*. 2014 Oct;24(10):1445-54.
54. Hardick J, Metzgar D, Risen L, Myers C, Balansay M, Malcom T et al. Initial performance evaluation of a spotted array Mobile Analysis Platform (MAP) for the detection of influenza A/B, RSV, and MERS coronavirus. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018 Jul;91(3):245-247.
55. Bruning A, Aatola H, Toivola H, Ikonen N, Savolainen-Kopra C, Blomqvist S et al. Rapid detection and monitoring of human coronavirus infections. *New Microbes New Infect*. 2018 Jul; 24: 52-55.
56. Mak G, Cheng P, Lau S, Wong K, Lau C, Lam E et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *J Clin Virol*. 2020 Jun;129:104500.
57. Scohy, A., Anantharajah, A., Bodéus, M., Kabamba-Mukadi, B., Verroken, A. and Rodriguez-Villalobos, H., 2020. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *J Clin Virol*. 2020 May 21;129:104455.
58. Sheridan C. Fast, portable tests come online to curb coronavirus pandemic. *Nat Biotechnol*. 2020 May;38(5):515-518.
59. Le Bert N, Tan A, Kunasegaran K, Tham C, Hafezi M, Chia A et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020;.
60. Abbasi J. The Promise and Peril of Antibody Testing for COVID-19. *JAMA*. 2020;323(19):1881.
61. Brochot E, Demey B, Touze A, Belouzard S, Dubuisson J, Schmit J et al. Anti-Spike, anti-Nucleocapsid and neutralizing antibodies in SARS-CoV-2 inpatients and asymptomatic carriers. 2020;.
62. Ong D, de Man S, Lindeboom F, Koeleman J. Comparison of diagnostic accuracies of rapid serological tests and ELISA to molecular diagnostics in patients with suspected coronavirus disease 2019 presenting to the hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Aug; 26(8): 1094.e7-1094.e10.

63. Meyer B, Drosten C, Müller M. Serological assays for emerging coronaviruses: Challenges and pitfalls. *Virus Res.* 2014;194:175-83.
64. Sharfstein J, Becker S, Mello M. Diagnostic Testing for the Novel Coronavirus. *JAMA.* 2020;323(15):1437.
65. In Vitro Diagnostics EUAs [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. 2020 [citado 28 Julio 2020]. Disponible en: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/vitro-diagnostics-euas>
66. Emergency Use Authorization [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. 2020 [citado 28 Julio 2020]. Disponible: <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/emergency-use-authorization>
67. Watson J. Interpreting a covid-19 test result. *British Medical Journal* [Internet]. 2020;369. Disponible: <https://www.bmj.com/content/bmj/369/bmj.m1808.full.pdf>
68. Wang Y, Kang H, Liu X, Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *J Med Virol.* 2020 Jun;92(6):538-539.
69. Li D, Wang D, Dong J, Wang N, Huang H, Xu H et al. False-Negative Results of Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Role of Deep-Learning-Based CT Diagnosis and Insights from Two Cases. *Korean J Radiol.* 2020 Apr;21(4):505-508.
70. Younes N, Al-Sadeq D, AL-Jighefee H, Younes S, Al-Jamal O, Daas H et al. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses.* 2020 May;12(6):E582.